

**MARCELO ALVES ARANHA**

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS TIPO I E  
TIPO III, DO TECIDO URETRAL DE RATAS SUBMETIDAS À  
SIMULAÇÃO DE TRABALHO DE PARTO E OOFORECTOMIA:  
ESTUDO ESTEREOLÓGICO**

**CURITIBA**

**2009**

**MARCELO ALVES ARANHA**

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS TIPO I E  
TIPO III, DO TECIDO URETRAL DE RATAS SUBMETIDAS À  
SIMULAÇÃO DE TRABALHO DE PARTO E OOFORECTOMIA:  
ESTUDO ESTEREOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica,  
Departamento de Cirurgia,  
Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Tambara  
Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério de  
Fraga

**CURITIBA**

**2009**

Dedico este trabalho a meus pais Ayrton e Juçara  
e a minha futura esposa Flávia.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

A meu orientador, Prof. Dr. Renato Tambara, pela paciência, pelo incentivo e pelo exemplo, desde os tempos da disciplina de urologia.

Ao companheiro Rogério de Fraga, pelo apoio e incentivo incondicionais e, pelo exemplo de interesse na pesquisa.

A minha namorada, Flávia Albuquerque da Silva, pelo carinho, pelo companheirismo, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.

A meus pais Ayrton Aranha e Juçara Aranha, pela educação privilegiada, pelos princípios (que procuro colocar em prática todos os dias), pelo carinho e pelo suporte em todos estes anos.

A meus irmãos, Ayrton Aranha, pelo exemplo de todos os dias e, Alexandre Aranha, pela capacidade de nos fazer rir, mesmo nos momentos mais difíceis.

À Prof<sup>a</sup> Djanira Veronez, por sua dedicação, simpatia e prestatividade sem limites.

Aos doutores Carlos Miner Navarro, Eduardo Wietskowski e Helio Sergio Portugal pela fundamental participação no experimento.

Ao professor Édison Luiz P. Farias, pelo suporte e orientações durante a realização do experimento.

Aos acadêmicos Gustavo Marques e Camilo Dallagnol pelo auxílio durante todo o projeto.

À Dra. Regina de Paula Xavier Gomes pela confecção das lâminas e ideias.

A meus colegas do Exército Brasileiro: Frederico Marcelo de Souza Coelho, Alexandre Cavalheiro Cavalli e Gustavo Marquesini Paul, pelo apoio e coleguismo.

Ao Coronel Basso e ao Sargento Costa, pelo apoio no ambulatório do HGeC. Sem este, certamente este trabalho não estaria concluído.

À Prof<sup>a</sup> Rosana Nogueira de Moraes do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela dosagem do estrogênio.

À Prof<sup>a</sup> Lucelia Donatti do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná

Ao Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Paraná pelo espaço físico.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Paraná.

A todos os funcionários do Biotério, que tornaram possível este estudo.

*“Vencer a si próprio é a maior das vitórias”.*

*Platão.*

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS TIPO I E TIPO III, DO TECIDO URETRAL DE RATAS SUBMETIDAS À SIMULAÇÃO DE TRABALHO DE PARTO E OOFORECTOMIA: ESTUDO ESTEREOLÓGICO**

**Introdução:** A incontinência urinária de esforço é um problema que afeta milhões de mulheres em todo o mundo. Embora o assunto seja avaliado de diversas formas, sua etiologia ainda não está completamente elucidada. **Objetivo:** analisar, através da estereologia, as características das fibras colágenas do tecido uretral de ratas submetidas à simulação de trabalho de parto, comparando entre diferentes grupos, os efeitos do período prolongado e hipoestrogenismo. **Material e Método:** foram avaliadas 60 ratas, divididas em seis grupos: controles virgens; controles ooforectomizadas; ratas submetidas à distensão vaginal por 30 minutos; ratas submetidas à distensão vaginal por 30 minutos + ooforectomia; ratas submetidas à distensão vaginal por 120 minutos; ratas submetidas à distensão vaginal por 120 minutos + ooforectomia. Após 60 dias os animais foram eutanasiados, sua uretra foi dissecada e retirada. O material foi analisado através da estereologia buscando verificar alterações de fibras. **Resultados:** não verificamos entre os grupos avaliados alterações de peso. Verificou-se redução da concentração de fibras colágenas tipo I nos grupos submetidos à ooforectomia, ooforectomia + distensão vaginal por 30 minutos e distensão vaginal por 120 minutos, quando comparados com o grupo controle. A quantidade de fibras colágenas tipos III se manteve entre os grupos não ooforectomizados. Quando comparados os grupos submetidos à distensão vaginal por 30 minutos + ooforectomia e distensão vaginal por 120 minutos + ooforectomia, verificamos um aumento da concentração das fibras colágenas Tipo I. **Conclusões:** a ooforectomia parece proporcionar uma redução da concentração de colágeno tipo I, assim como a persistência dos níveis de estrogênio favorece a manutenção das fibras tipo III; entre ratas ooforectomizadas a distensão vaginal prolongada favorece um incremento da concentração de fibras colágenas tipo I.

**Palavras-chave:** Colágeno. Uretra. Estrogênio.

## ABSTRACT

### QUANTITATIVE EVALUATION OF TYPE I AND III COLLAGEN FIBRES FROM URETHRAL TISSUE OF RATS SUBMITTED TO LABOR AND OVARECTOMY: STEREOLOGICAL STUDY

**Background:** stress urinary incontinence is a health problem that affects millions of women in the whole world. Although the subject is evaluated of diverse forms, its etiology not yet completely is elucidated. **Aim:** to analyze, through stereology, the characteristics of collagen fibres in urethral tissue of rats submitted to the simulation of childbirth work, comparing between different groups, the effect of the drawn out period hypoestrogenism. **Material and Method:** 60 rats had been evaluated, divided in six groups: virgin controls; ovariectomized controls; rats submitted to the vaginal distension (VD) per 30 minutes; rats submitted to the vaginal distension per 30 minutes + ovariectomy (OX); rats submitted to the vaginal distension per 120 minutes; rats submitted to the vaginal distension per 120 minutes + ovariectomy. After 60 days the animals had been sacrificed, its urethra was removed. The material was analyzed through stereology trying to verify fibre alterations. **Results:** we do not verify alterations of weight between the evaluated groups. We verify reduction of the type I collagen fibres concentration in the groups submitted to the ovariectomy, ovariectomy + vaginal distension per 30 minutes and vaginal distension per 120 minutes, when compared with controls. Collagen type III fibres concentration was stable on no ovariectomized groups. When compared groups, the vaginal distension per 30 minutes + ovariectomy and vaginal distension per 120 minutes + ovariectomy, we verify an increase of the type I collagen fibres concentration fibres. **Conclusions:** the ovariectomy seems to provide a reduction in the concentration of collagen type I, as well as the maintenance of the estrogen levels favors the maintenance of fibres type III; between ovariectomized rats VD favors an increment of the collagen type I fibres concentration.

.

**Keywords:** Collagen. Urethra. Estrogen.

.



## LISTA DE ABREVIATURAS

IUE	INCONTINÊNCIA URINÁRIA DE ESFORÇO
IMC	ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA
DV	DISTENSÃO VAGINAL
OOF / OVX	OOFORECTOMIA
OB	OOFORECTOMIA BILATERAL
LNP	LESÃO DE NERVO PUDENDO
CPK	CREATINOFOSFOQUINASE
LDH	DESIDROGENASE LÁTICA
COL	COLÁGENO

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1. OBJETIVO.....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE AVALIAÇÃO DA INCONTINÊNCIA URINÁRIA .....	17
2.2. MODELOS DE DISTENSÃO VAGINAL E CONJUGADOS.....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>25</b>
3.1. DOSAGEM DE ESTRADIOL.....	27
3.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDOS.....	27
3.3. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DAS FIBRAS COLÁGENAS TIPO I E TIPO III DE URETRA.....	28
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
3.5. ILUSTRAÇÕES (EXTRAÇÃO DOS TECIDOS) .....	29
3.6. ILUSTRAÇÕES (IMAGENS DAS LÂMINAS) .....	30
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. ANÁLISE GERAL E DO ESTROGÊNIO.....	36
4.2. ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENAS.....	39
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1. MODELOS DE DISTENSÃO VAGINAL .....	43
5.2. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO .....	45
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-UFPR .....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE 1 - TABELAS (AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA).....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 2 - TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE HEMOTOXILINA E EOSINA .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 3 - TÉCNICA DECOLORAÇÃO DE PICROSÍRIUS.....</b>	<b>62</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A incontinência urinária de esforço (IUE) é um problema que afeta cerca de 25 milhões de mulheres nos Estados Unidos da América e estatísticas mostram que cerca de 30 a 40% das mulheres sofrerão algum grau de incontinência ao longo da vida (1,2). Rortveit *et al.* relataram uma prevalência variando de 8 até 32% entre mulheres nulíparas, sendo maiores as ocorrências em idades mais avançadas (3). Estudos relatam ainda que os diâmetros de entrada e saída são fatores de risco para o desenvolvimento da incontinência, confirmando a teoria de que a evolução humana selecionou mulheres com maiores dimensões pélvicas devido ao crescimento do diâmetro cefálico dos neonatos (4).

Avanços da medicina proporcionam um aumento na expectativa de vida, resultando em uma população de mulheres vivendo um longo período após a menopausa, gerando assim problemas médicos. Entre estes devem ser considerados os prolapsos urogenitais, cuja prevalência e incidência aumentam com o decorrer da idade.

A melhor compreensão das causas da incontinência é necessária para o desenvolvimento de modalidades de tratamento mais efetivas. As alterações do assoalho pélvico têm sido muito estudadas ultimamente. Atualmente, muitas mulheres têm optado pelo parto cesárea eletivo no intuito de evitar morbidades como incontinência urinária e/ou fecal e prolapsos, que apresentam relação epidemiológica com o parto vaginal. O aumento do índice de massa corpórea (IMC) na gravidez, a multiparidade, o parto vaginal, o tempo prolongado do segundo período do parto e a episiotomia são fatores que diminuem a força dos músculos do assoalho pélvico (5). Porém, não há um consenso se a gravidez ou o parto vaginal são responsáveis pelas altas taxas de morbidade do assoalho pélvico (6).

O trabalho de parto tem sido relacionado com lesões do nervo podendo, denervação parcial do assoalho pélvico e redução dos parâmetros de pressão uretral (7). Estudos concluíram que o parto vaginal é responsável por alterações na inervação e na porção pubococcígea do músculo levantador do ânus (8). Snooks *et al.* observaram alterações significativas de denervação dos músculos do assoalho pélvico através de eletromiografia e, postularam que a deservação deste grupo

seria a principal causa da patogênese da IUE e incontinência fecal (9). Outros estudos utilizando animais ooforectomizados relatam que a deficiência na síntese do estrógeno é um fator que contribui para a incontinência urinária. A ooforectomia resulta em alterações morfológicas e funcionais para bexiga e uretra que são revertidas pela reposição hormonal (10). Clinicamente foi observado que o período de pós-menopausa está relacionado com maior incidência de sintomas como urgência urinária, noctúria, incontinência de esforço (11). A avaliação urodinâmica dessas mulheres mostrou um decréscimo na pressão de fechamento da uretra comparado com controles (12). No entanto há dados conflitantes, uma vez que parte das mulheres que sofrem de incontinência, durante o parto ou pós-parto, se recuperam após alguns meses ou semanas (13). Não obstante, a incontinência urinária está presente em mulheres nulíparas e alguns estudos neurofisiológicos têm falhado em demonstrar lesão significativa da inervação muscular após o parto vaginal (14).

Estudos experimentais, que simulem as lesões do parto vaginal, são importantes para a melhor compreensão da fisiopatologia das morbidades do assoalho pélvico; para tanto se desenvolveram vários modelos, cada qual analisando diferentes aspectos e componentes do mecanismo de continência. Este, por sua vez, deve ser encarado como a somatória de fatores que atuam de forma concomitante, como a topografia anatômica das estruturas envolvidas, os componentes vascular e muscular periuretrais, a musculatura pélvica e a inervação das mesmas (15).

O arcabouço estrutural que participa do mecanismo de continência consiste em fibras musculares e matriz extracelular que, através de seus diversos componentes, como fibras elásticas, colágenas, elastinas e oxitalâmicas, conferem a capacidade de sustentação e resistência aos esforços, bem como retorno à forma normal (15,16,17).

Durante o trabalho de parto, a compressão fetal é responsável pelo estiramento de estruturas pélvicas, o que pode acarretar modificações anatômicas e funcionais, levando à incontinência (8,15,18,19). A exemplo de alterações histológicas, Hale *et al* analisaram biópsias de tecido uretral, verificando uma redução da quantidade de fibras musculares estriadas, bem como infiltração por tecido conjuntivo (20).

A matriz extracelular parece exercer um papel importante no mecanismo de continência (15). Embora haja dificuldade para determinar seus componentes, sabe-se que ela deve apresentar as funções de resistência às forças de tensão e compressão e, capacidade de recuperar a forma. Enquanto as fibras colágenas conferem resistência, as fibras elásticas fornecem propriedades elásticas (17,21).

O papel do colágeno é discutido como componente da matriz, principalmente sua relação com a IUE. Nesta linha, Falconer *et al* (1994) observaram a redução da síntese de colágeno em mulheres incontinentes, através da cultura de fibroblastos pós-biópsia de pele; postulando que esta deficiência acarretaria em alterações do mecanismo de sustentação (22). Bergman *et al* (1994) avaliaram biópsias de pele e ligamento útero-sacro de mulheres submetidas a procedimentos ginecológicos, verificando a redução da quantidade de colágeno tipo III nas incontinentes em comparação com as que não apresentavam IUE, independentemente de alterações do assoalho pélvico (23).

Por meio de biópsias de tecido periuretral de nulíparas pré-menopausadas, Keane *et al* (1998) verificaram a redução da quantidade total de colágeno, bem como a redução concentração dos colágenos tipo I e III, em comparação aos controles (24). Em um estudo semelhante, porém utilizando tecido extraído da fáscia pubocervical, Recheberger *et al* (1998) constataram um conteúdo reduzido de colágeno nas pacientes incontinentes submetidas à cirurgia uroginecológica (25). Falconer *et al*, em 1998, avaliando tecido periuretral de mulheres incontinentes submetidas à biópsia, verificaram que as mesmas apresentavam uma quantidade 30% maior de fibras colágenas e que estas fibras apresentavam-se 30% maiores que os controles continentas. O mesmo postulou que isso deve fornecer maior rigidez à matriz extracelular, acarretando em falha na função mecânica (26).

Por outro lado, Cör A *et al* (2003), através de biópsias de fáscia endopélvica, não constataram diferença significativa da quantidade de fibras colágenas tipo I e III entre os grupos de mulheres continentas e incontinentes. Observaram, contudo, menor quantidade de fibras elásticas em pacientes que apresentavam IUE (27).

A estereologia pode ser definida como método de estudo que visa quantificar, através de densidades, elementos de determinada amostra; fornecendo, por meio de uma análise bidimensional, uma ideia tridimensional. Desta forma, o método extrapola a análise morfológica, pois fornece dados morfométricos (28). Sua

aplicabilidade relaciona-se com diversas áreas da ciência. No campo da urologia pode-se mencionar os estudos de Rocha, Cullen e Augsburg (15,29,30).

Com base nestas afirmações, desenvolveu-se este estudo, a fim de quantificar, por meio de estereologia, as fibras colágenas de ratas submetidas à simulação de trabalho de parto mais ooforectomia.

### 1.1.OBJETIVO

Este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

1. Avaliar, através estereologia, as fibras colágenas tipo I e tipo III no tecido uretral de ratas submetidas à simulação de trabalho de parto e ooforectomia.
2. Comparar as diferenças nas concentrações de colágeno entre ratas ooforectomizadas e não ooforectomizadas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE AVALIAÇÃO DA INCONTINÊNCIA URINÁRIA

A despeito de sua elevada prevalência e impacto socioeconômico, a incontinência urinária genuína de esforço (IUE) ainda não apresenta sua fisiopatologia completamente elucidada (31,42).

Na tentativa de esclarecer este mecanismo, pode-se utilizar estudos epidemiológicos ou estatísticos. Porém, as limitações inerentes aos estudos clínicos não possibilitam ao pesquisador estabelecer relações entre causa e efeito mediante situações controladas. Assim, surge a necessidade de desenvolvimento de modelos animais, que podem fornecer dados objetivos não só voltados à compreensão da gênese, mas também na avaliação das diversas formas de tratamento (31).

Desde o desenvolvimento do primeiro modelo experimental, em 1998, por Lin *et al* (1998), inúmeros autores têm publicado experimentos referentes ao tema. Com isso, os modelos experimentais de avaliação da IUE podem ser classificados, de acordo com a duração da lesão causada, em temporários e duráveis. Os modelos duráveis descritos são: uretrólise (32), cauterização uretral (35), transecção do nervo pudendo (33) e utilização de toxina botulínica (34). Os modelos temporários constituem-se em distensão vaginal (50,51,52,53), lesão do nervo pudendo (45,46,47) e os modelos combinados (60,61,62).

Rodrigues *et al* (2005) desenvolveram um modelo criando disfunção duradoura, com a finalidade de testar formas de tratamento. Através da uretrólise em ratas observaram a redução da pressão de perda em cerca de 50%, a qual persistia após 24 semanas (32).

Em outra linha, Peng *et al* (2006) realizaram a transecção do nervo pudendo, verificando a redução das pressões de perda, mais acentuada no grupo com secção bilateral (33).

Takahasi *et al* (2006) utilizaram a injeção periuretral de toxina botlínica, 10U/200ul, com resultante redução da pressão de perda após duas semanas. A recuperação funcional ocorreu 6 semanas após a intervenção (34).

Chermansky *et al* (2006) desenvolveram um modelo de cauterização uretral, com redução da pressão uretral em relação aos controles, bem como observou disjunção de fibras do esfíncter estriado e denervação após 16 semanas (35).

O nervo pudendo, responsável pela inervação do esfíncter uretral estriado, atravessa o canal de Alcock e é vulnerável a lesões por esmagamento durante o trabalho de parto (8). O tempo de latência motora, que consiste no período entre o estímulo nervoso e a resposta motora, aumenta com número de fibras mielinizadas e diminui com a lesão (36,37). O tempo de latência motora apresenta relação positiva com a idade avançada, parto vaginal e incontinência urinária de esforço (38,39,40). Partindo dessas premissas foram criados os modelos para avaliar as lesões por esmagamento do nervo pudendo.

Kerns *et al.*, em 2000, avaliaram um grupo de 5 ratas submetidas a lesão, encontrando alterações miccionias nas duas primeiras semanas. Após 90 dias, verificaram sinais de regeneração à análise por microscopia eletrônica (41).

Damaser *et al* desenvolveram em 2003, um modelo no qual empregaram o esmagamento bilateral dos nervos pudendos na fossa isquiorretal. Através da análise funcional, verificaram a redução importante da pressão de perda nas ratas submetidas a lesão, bem como o aumento do número de fascículos nervosos em degeneração próximos ao esfíncter estriado (42). O mesmo grupo de autores verificou, em outro estudo, o retorno das características funcionais, mas não anatômicas, duas semanas após o processo (43).

Buscando avaliar fatores que proporcionam a recuperação anátomo-funcional, Ahmed *et al* (2006), submeteram um grupo de ratas à lesão de nervo pudendo pós-ooforectomia bilateral. Comparando a resposta nas ratas em que foi realizada reposição de estrogênio, observaram melhor resposta neuro regenerativa, através da expressão do RNA mensageiro de tubulina  $\beta$ II; concluindo que o estrogênio apresenta propriedades neuroregerativas (44). Conclusões semelhantes foram obtidas por Kane *et al.* (2004) (45).

## 2.2. MODELOS DE DISTENSÃO VAGINAL E MODELOS DE DISTENSÃO VAGINAL ASSOCIADA À LESÃO DO NERVO PUDENDO

Quanto à distensão vaginal (DV), foram desenvolvidos inúmeros protocolos, com distintas características na execução e diferentes formas de análise. Porém todos eles têm em comum o fato de distender a cavidade vaginal com sonda de Foley. O tamanho do cateter, o volume de solução fornecido ao balão e período de distensão varia segundo o estudo (31).

O primeiro modelo foi desenvolvido por Lin *et al*, em 1998. Neste estudo foi introduzida uma sonda de Foley (10 Fr) na vagina dos animais, que teve seu balonete insuflado com 2,5 ml de água e permaneceu por 4 horas. As ratas foram avaliadas do ponto de vista funcional, através da irritação de suas narinas proporcionando um reflexo de espirro, averiguando a presença de incontinência. A análise bioquímica foi realizada através da creatinofosfoquinase (CPK) e desidrogenase láctica (LDH) séricas. Verificação histológica, após 4 semanas, demonstrou uma redução de fibras musculares lisas e estriadas na ratas incontinentes, bem como redução dos plexos ganglionares na parede vaginal (46).

Canon *et al* em 2002, estratificaram os grupos segundo o período de tempo de distensão. Após introdução de cateter (10 Fr), o mesmo teve seu balonete insuflado com 3 ml de solução, o período de permanência foi de 30 minutos, uma hora, ou realizado de forma intermitente. O grupo submetido à distensão prolongada apresentou redução significativa da pressão de perda, o que não foi observado nos grupos com período curto ou dilatação intermitente. A distensão prolongada proporcionou também uma marcante disjunção de fibras, associada ao adelgaçamento da musculatura estriada uretral (47).

Damaser *et al*, em 2003, avaliaram DV, inicialmente com inserção de sondas de diâmetros progressivamente maiores, seguida da inserção de um cateter de Foley 10 Fr, que teve seu balão insuflado com 3 ml de soro fisiológico, removido após 30 minutos. Obteve redução das pressões de perda no grupo de estudo, assim como maior degeneração de fascículos nervosos à microscopia eletrônica (42).

Pan *et al*, analisaram 69 ratas submetidas à DV, com Foley (10 Fr), balonete insuflado com 3 ml de solução, por períodos de uma e quatro horas, após dilatação

vaginal com sondas de calibre gradativamente maior. Os animais foram avaliados do ponto de vista funcional e histológico com 4 e 10 dias e 6 semanas. Verificou-se redução do LPP em todos os grupos no quarto dia. No décimo dia a redução foi mais acentuada no grupo de 4 horas. Com 6 semanas os valores foram próximos dos controles. A análise histológica demonstrou disjunção e afilamento da musculatura estriada uretral no quarto e décimo dias. Na sexta semana os grupos de DV prolongada ainda demonstraram características de remodelação (48).

Em uma análise funcional, Kamo (2006) verificou perda urinária em um grupo de ratas submetidas à DV, não observada nos controles e, através da mensuração de pressão em distintos pontos da uretra, concluiu que a perda se deve a alterações na uretra média (49).

Partindo da premissa de que a hipóxia seria a grande responsável pelas lesões urológicas do trabalho de parto, Damasser *et al* (2005) analisaram, através do estudo de microesferas e imuno-histoquímica, o tecido vaginal, uretral e vesical de ratas submetidas à DV, concluindo que a hipoxia é o mecanismo de lesão envolvido nos distúrbios urinários pós parto (50).

Prantil *et al*, em 2006, analisaram ratas submetidas à DV, com 4 ml de insuflação no balão, por um período de 4 horas. Constataram, através de análise biomecânica, que o processo acarreta alteração do tonus basal, redução da complacência uretral e da rigidez distal (51).

Avaliando ratas prenhas, Rocha (2004), submeteu-as à DV com sonda de 10 Fr, 3 ml de insuflação no balonete por 4 horas. Pesquisou, por meio de estudo imuno-histoquímico e estereologia, animais submetidos a parto cesareana e parto natural. Verificou a diminuição das fibras nervosas e musculares, aumento das fibras colágenas e elásticas, bem como aumento da relação colágeno/fibra muscular, no grupo submetido a parto natural e DV (15).

Com o intuito de averiguar os efeitos causados pela privação hormonal às lesões decorrentes do trabalho de parto, foram desenvolvidos modelos que associam DV à ooforectomia bilateral (OB), simulando a menopausa ou redução estrogênica.

Sievert *et al*, em 2001, propuseram um modelo de estudo em ratas grávidas. Imediatamente após o parto, os animais foram submetidos à ooforectomia associada à DV. Comparando os grupos, verificaram, através de microscopia eletrônica e

imuno-histoquímica, diferenças histológicas significativas nos grupos submetidos à DV, associada ou não a ooforectomia (52).

Resplande *et al* (2002), seguindo a mesma linha, aplicaram o procedimento (DV + OB) em 14 ratas prenhas, imediatamente após o parto. Comparando-as aos controles, verificaram, por meio de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica, 9 meses após a intervenção, elevação do índice de apoptose uretral e alterações da musculatura, como aumento dos espaços intercelulares e maior depósito de colágeno (53).

Kuo (2002), estudando uma amostra de 96 ratas, organizadas em grupos submetidos a trauma vaginal único ou múltiplos e OB após 4 ou 12 semanas. Observou a análise histológica, degeneração e hialinização nas camadas musculares do grupo submetido à ooforectomia somada a múltiplos traumas vaginais (54).

Ferguson *et al* (2005), buscando avaliar propriedades neurorregenerativas do nervo pudendo em ratas submetidas à DV + OB, estudaram a hibridização *in situ* da unidade beta do RNA da tubulina, um marcador do processo neurorregenerativo. Não encontraram diferença estatística entre os grupos avaliados (55).

Como uma tentativa de aproximar os experimentos aos danos ocasionados pelo trabalho de parto, foram criados modelos onde se empregam técnicas de distensão vaginal associadas à lesão do nervo pudendo (LNP).

Damaser *et al.*, em 2007, desenvolveram um modelo aplicando DV associada à LNP. Verificaram, nesta análise a diferença de expressão de neurotrofina comparando os diferentes tipos de lesão (56).

Pan *et al* (2009) avaliaram 140 ratas, divididas em 4 grupos: DV, DV somada a LNP, LNP e controle. Do ponto de vista funcional, verificaram um decréscimo da pressão de perda com 4 dias em todos os grupos submetidos à lesão. Dez dias após, apenas os grupos DV mais LNP e LNP mantiveram a redução, com 21 dias, todos haviam retornado à linha de base. As alterações histológicas, disjunção de fibras musculares, foram observadas até o 21 dia no grupo submetido à DV + LNP, confirmando, assim, o retardo na recuperação anatômica neste grupo (57).

Jiang *et al* (2009), em um estudo muito semelhante, confirmaram o retardo na recuperação funcional do nervo pudendo, quando compararam os animais submetidos à DV associada à LNP, com DV ou LNP isolados (58).

Atualmente, a busca por métodos quantitativos, que possam expressar as modificações estruturais nos diferentes tecidos, tem sido foco de debate. A necessidade de estabelecer métodos confiáveis para esta análise é fundamental para a manutenção da qualidade técnica dos estudos. Há várias metodologias que visam atender esta condição, sendo a estereologia uma das que tem se apresentado na literatura com perfil de credibilidade satisfatório (28).

A Estereologia pode ser definida como a uma ciência que visa determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais, utilizando a geometria e a estatística para esta aferição (28). As primeiras ideias que serviram de fundamento para o método foram lançadas por Delesse, em 1848, que postulou: “relação entre as áreas de determinado mineral na superfície de corte da rocha é a mesma daquela que existe entre o volume do mineral e volume total da rocha”. Desta forma pode-se inferir que o volume de determinado tecido em uma área da amostra estabelece uma relação com o volume total deste tecido em determinado órgão, possibilitando a elucidação das composições teciduais (28,59).

Os estudos estereológicos são desenvolvidos sob estruturas macroscópicas, mesoscópicas e microscópicas, nesta última, convencionalmente obtem-se dados a partir da análise das lâminas de microscopia óptica e eletrônica. Enquanto os estudos morfométricos utilizam escalas aferidas, a estereologia baseia-se em princípios geométricos e estatísticos (28).

A estereologia manual se utiliza de sistemas-teste para sua aferição, que correspondem a um conjunto de linhas (retas ou curvas) e pontos. Esses são superpostos à imagem morfológica para a contagem estereológica. Podem ser construídos a partir de um arranjo regular ou aleatório.

Existem diversos sistemas-teste propostos para variados fins. Tradicionalmente são desenhados com retas, ou segmentos de reta, apresentando os arranjos triangular, quadrado ou hexagonal. Cada um destes arranjos determina as características básicas do sistema-teste (59).

Atualmente, a análise estereológica foi aprimorada, recebendo o auxílio de programas computacionais que facilitam a obtenção das medidas estereológicas pesquisadas, otimizando o tempo de coleta e o processamento dos dados.

Desta forma, constitui-se em um método adequado para a natureza do presente estudo, que visa quantificar as alterações nas concentrações de colágeno na uretra de ratas submetidas a fatores possivelmente modificadores das mesmas, como a distensão vaginal e hipo-estrogenismo.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**



### 3. MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas no estudo 60 ratas adultas raça Wistar, com idade média de 120 dias, oriundas do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. O estudo foi autorizado pelo CEEA, Comitê de Ética em Experimentação Animal. O peso das ratas variou de 200 a 250 gramas. As ratas foram distribuídas em seis grupos:

Grupo A (controle): 10 ratas virgens.

Grupo B (controle ooforectomizado): 10 ratas virgens submetidas à ooforectomia.

Grupo C: 10 ratas submetidas à distensão vaginal por 30 minutos.

Grupo D: 10 ratas submetidas à distensão vaginal por 30 minutos e posterior ooforectomia.

Grupo E: 10 ratas submetidas à distensão vaginal por 120 minutos.

Grupo F: 10 ratas submetidas à distensão vaginal por 120 minutos e posterior ooforectomia.

Para simulação do trauma, as ratas foram anestesiadas com uma associação de Xilazina (5 mg/kg) e Ketamina (100 mg/Kg) intraperitoneal. Após indução anestésica, um cateter Foley (10 Fr) foi introduzido na vagina e o balão inflado com 3 ml de solução salina para atingir um diâmetro de 0,9 cm, que corresponde a duas vezes o diâmetro cefálico de um rato neonato. Após essa etapa, os animais foram posicionados na beira da mesa com membros inferiores sobre o abdômen e o cateter ficou insuflado pelo tempo determinado para cada grupo. O balão referido simulou, durante o tempo específico para cada um dos grupos do estudo, a pressão que o feto realiza sobre o assoalho pélvico no segundo período do trabalho de parto. Nos casos em que ocorreu a queda do cateter, o balão foi reinsuflado e recolocado em sua posição original. Após o período determinado, o cateter foi retirado com o balão insuflado.

Durante todo o procedimento, as ratas foram mantidas sob anestesia, segundo o protocolo anestésico referido anteriormente.

A ooforectomia foi realizada imediatamente após a distensão vaginal através utilizando o mesmo protocolo anestésico. O animal anestesiado foi então deitado dorsalmente, expondo a região ventral para o cirurgião. Neste momento os animais

encontravam-se imobilizados em mesa cirúrgica apropriada. Foi realizada tricotomia abdominal nos animais, seguida do procedimento realizado segundo técnica asséptica. Foi realizada uma incisão mediana com bisturi (lâmina 15) na pele, na linha mediana dos animais. Os planos músculo-aponeuróticos foram também seccionados com exposição da cavidade abdominal, assim ganhou-se o espaço peritoneal. Sucedeu-se a exploração da cavidade, com identificação de referências anatômicas necessárias ao procedimento. Primeiramente a bexiga, em situação inferior, imediatamente posterior ao arcabouço pélvico. Em seguida foi identificado o útero, com seus dois cornos em sentido crânio lateral bilateral. Através da manipulação dos cornos uterinos os ovários foram localizados em posição póstero-lateral, circundados por uma pequena quantidade de gordura. O ovário foi tracionado cuidadosamente através da incisão, sem ser manipulado diretamente, apenas mobilizado com sua gordura, para evitar eventual perfuração e consequente implante de material ovariano e manutenção da função hormonal. A junção entre o útero e a trompa foi identificada e dissecada. Após o pinçamento com pinças hemostáticas foi realizada a secção da mesma, seguida da ligadura das extremidades com fio absorvível (catgut 4.0). Desta forma realizou-se o controle hemostático dos vasos sanguíneos da região. A peça cirúrgica, ovário circundado por gordura, foi cuidadosamente retirado da cavidade abdominal. O mesmo procedimento foi realizado do lado contralateral segundo a mesma técnica cirúrgica. Procedeu-se então a revisão da hemostasia da cavidade, o que não apresentou problemas maiores, tendo em vista que o procedimento não envolve vasos de grande porte. Foi então realizado o fechamento da cavidade através de sutura com pontos separados de mononylon 3.0, em plano único.

Todos os animais receberam no primeiro dia de pós-operatório medicação analgésica (dipirona) intramuscular e associada à hidratação.

Os animais foram alojados em gaiolas, em grupos de quatro indivíduos, onde permaneceram conforme o período proposto, durante o qual foram mantidos sob cuidados adequados. Foram alimentados e hidratados diariamente, com água potável e ração específica para a espécie. Os cuidados seguiram as orientações do *GUIDE TO THE CARE AND USE OF EXPERIMENTAL ANIMALS OF THE CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC)*. As ratas foram acomodadas no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

No dia anterior à eutanásia, as ratas foram separadas, cada qual em sua própria gaiola, onde foram identificadas e numeradas segundo os grupos aos quais pertenciam. Assim foi possível coletar as fezes de cada animal separadamente, bem como identificar o material extraído de cada uma delas.

### 3.1. DOSAGEM DE ESTRADIOL

A análise hormonal foi realizada através da dosagem de estradiol das fezes das ratas, coletadas nas 24 horas anteriores à eutanásia, segundo a técnica descrita previamente por Touma e Palme (60). O material obtido foi macerado, homogeneizado e diluído em 5 ml de solução (etanol 80%, água destilada 20%). As amostras foram vigorosamente misturadas por 30 minutos (através de processador multipulso) criando assim um extrato. Cada amostra foi centrifugada por 15 minutos, sendo retirado o sobrenadante, o qual foi diluído em solução de fosfato na proporção 1:1.

Os extratos foram analisados por radioimunoensaio (61), utilizando um anticorpo policlonal anti-estrógeno. Os resultados da análise foram submetidos à avaliação estatística.

### 3.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDOS

Ao final do período de 60 dias após o procedimento, as ratas foram eutanasiadas utilizando-se tiopental sódico intraperitoneal, seguindo-se imediatamente a remoção em bloco da bexiga, da uretra, da vagina e da musculatura do assoalho pélvico. Foi realizada, então, a dissecação meticulosa do tecido uretral e periuretral e o material extraído.

A uretra foi seccionada de forma longitudinal e posicionada em uma superfície de material sintético. As amostras foram submersas e fixadas durante 12 horas em formalina 10%.

Após a fixação, o material foi processado em histotécnico automatizado passando por banhos de álcool em concentração crescente (70, 80 e 100%) e posteriormente diafanizado em xilol. O material ficou, então, submerso em parafina líquida a 60°C, sendo, em seguida, emblocado e submetido a cortes histológicos

com 5µm de espessura em micrótomo rotativo. Foram confeccionadas 2 lâminas de cada bloco, coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e pelo vermelho picosírius.

### 3.3. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DAS FIBRAS COLÁGENAS TIPO I E TIPO III DE URETRA

A análise estereológica das fibras colágenas tipo I e tipo III da uretra feminina foi realizada a partir da observação das lâminas histológicas coradas através da técnica histoquímica Tricrômio de Picosírius com o auxílio do microscópio Olympus BX50 com câmara de captura de imagem 3CCD pró-séries.

O método de Tricrômico de Picosírius consiste basicamente na coloração da proteína colágeno. As fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja, amarelo e vermelho e representam o colágeno tipo I, enquanto que as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringente, apresentam-se coradas em verde, representando o colágeno tipo III.

Para análise histomorfológica e histomorfométrica utilizamos um microscópio da marca Olympus BX50 com câmeras de captura 3CCD pró-séries e o programa de captura de imagens será o Imageproplus versão 4.5 da Cybernetics®.

Foram analisados 05 campos histológicos aleatórios da uretra de 05 ratas, randomizadas entre os grupos, com ampliação de 400 vezes para a quantificação dos colágenos tipos I e III corados com Picosírius e analisados em microscopia com luz polarizada.

As imagens foram capturadas por câmara Olympus DP71 enviadas para um monitor Sony Trinitron® colorido, congeladas e digitalizadas por uma placa digitadora Oculus TCX (Coreco). Todas as imagens foram analisadas pelo aplicativo Image Pró-Plus para Windows em computador Pentium III.

Todos os valores obtidos foram transformados em porcentagem (%) para a obtenção da frequência relativa.

### 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram descritos utilizando-se média e desvio-padrão. A distribuição dos dados, quanto à normalidade, foi observada através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

O estudo das medidas segundo o grupo ooforectomizadas e não ooforectomizadas foi realizado através do teste T de Student (se os dados passaram pelo teste de distribuição normal) ou pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para o estudo das medidas em todos os grupos avaliados, utilizou-se a ANOVA (quando significativo), seguido das comparações múltiplas de Tukey. No caso de dados sem distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido (quando significativo) do teste de Mann-Whitney.

Foram elaborados gráficos do tipo BOX-PLOT para ilustrar a distribuição dos dados.

O nível de significância assumido foi de 5% e o *software* utilizado para análise foi o SAS versão 9.1

### 3.5. ILUSTRAÇÕES (EXTRAÇÃO DOS TECIDOS)



FIGURA 1 - RETIRADA DA URETRA 1 (RATA Nº 2, GRUPO A)

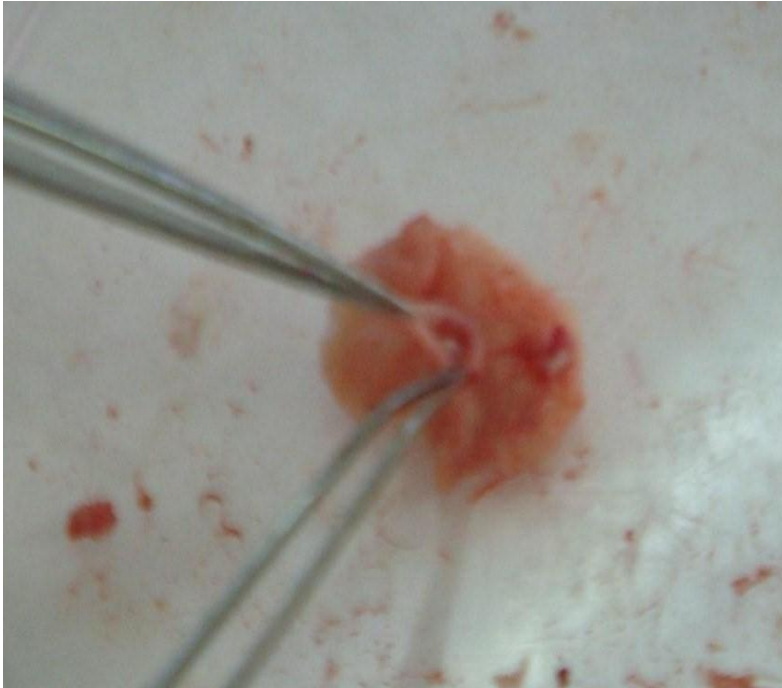


FIGURA 2 - RETIRADA DA URETRA 2 (RATA Nº 2, GRUPO A)

### 3.6. ILUSTRAÇÕES (IMAGENS DAS LÂMINAS)

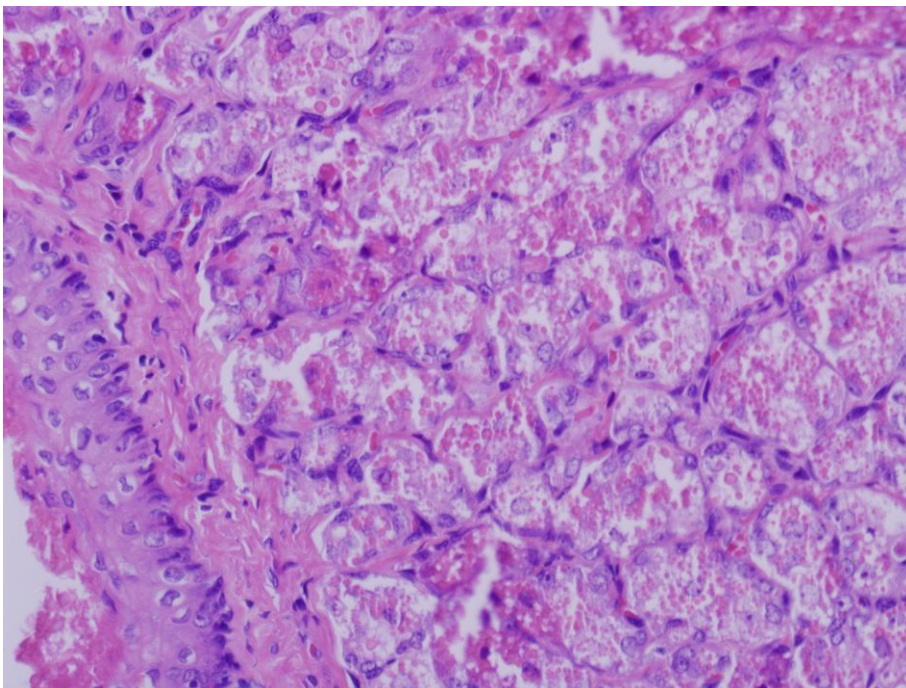


FIGURA 3 - COLORAÇÃO DE HE (RATA Nº 3, GRUPO C)



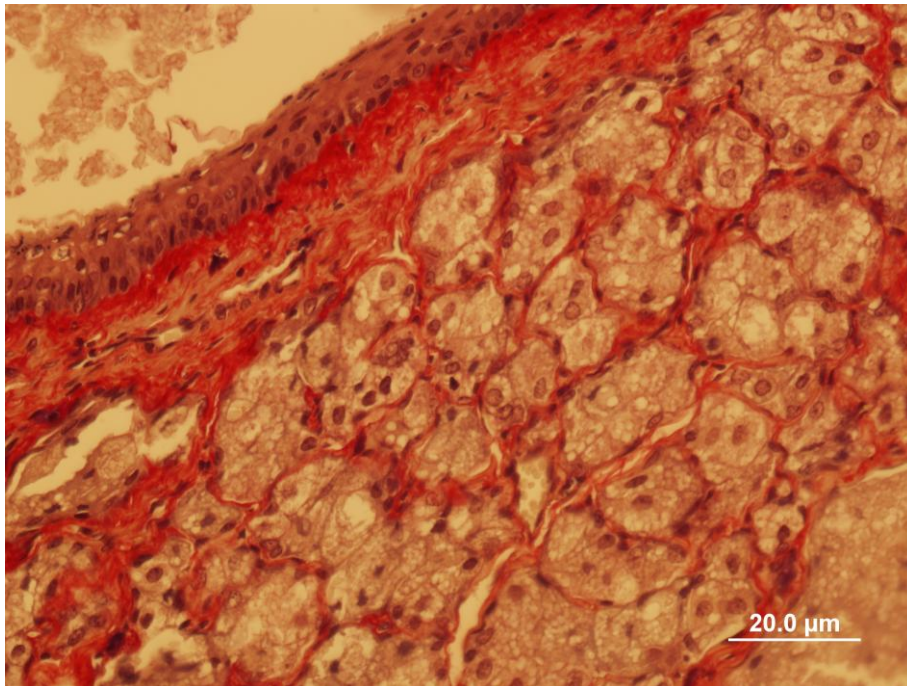


FIGURA 4 - COLORAÇÃO DE PICROSIRIUS (RATA Nº 7, GRUPO C)

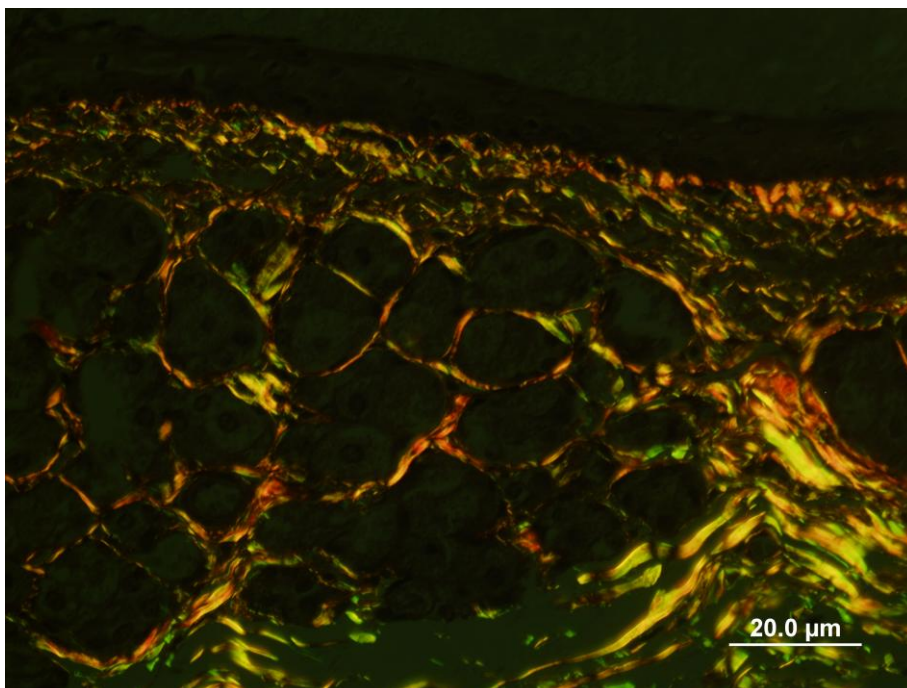


FIGURA 5 - PICROSIRIUS EM LUZ POLARIZADA (RATA Nº 3, GRUPO A)

NOTA: Colágeno Tipo I apresenta-se em tons de vermelho, amarelo e laranja; colágeno tipo III em tons de verde

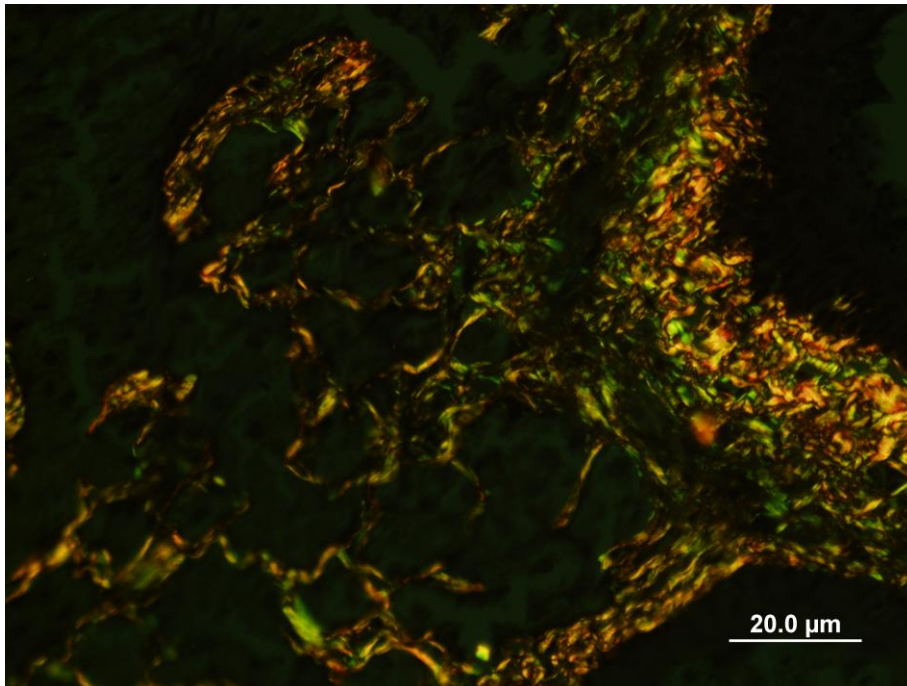


FIGURA 6 - PICROSIRIUS EM LUZ POLARIZADA (RATA Nº 6, GRUPO B)

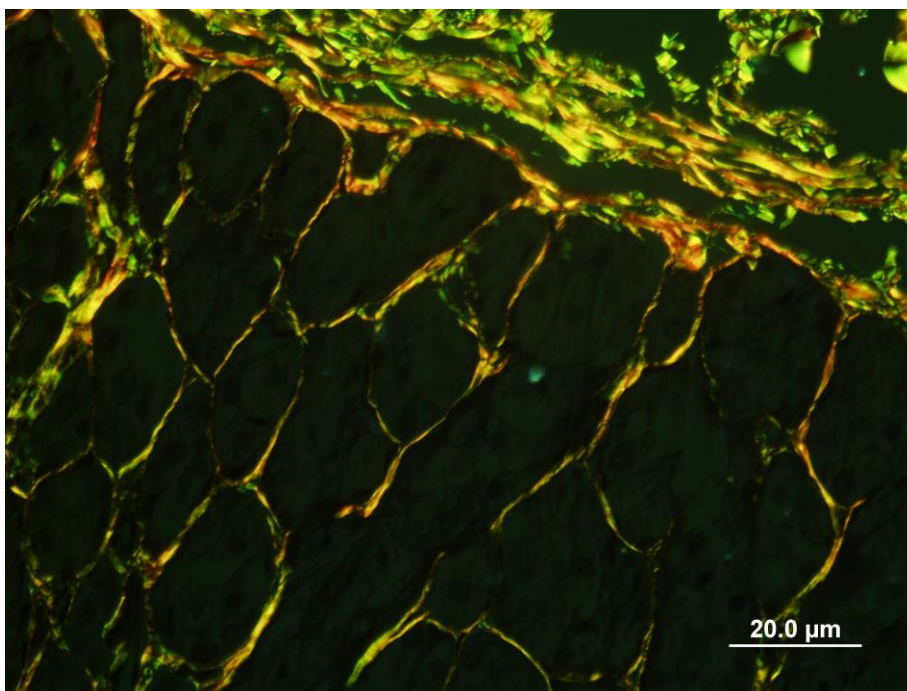


FIGURA 7 - PICROSIRIUS EM LUZ POLARIZADA (RATA Nº 5, GRUPO C)



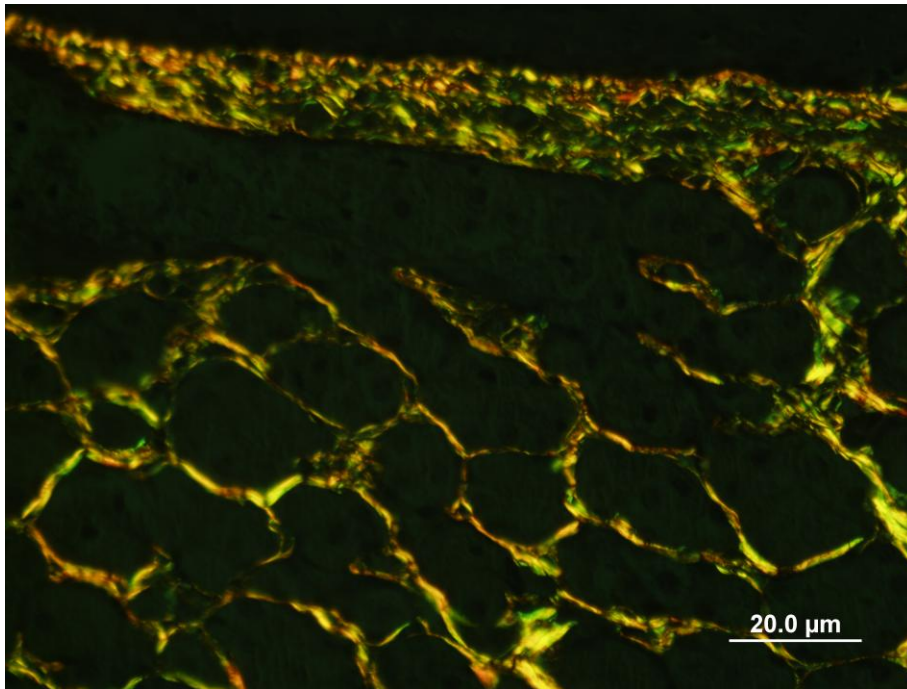


FIGURA 8 - PICROSIRIUS EM LUZ POLARIZADA (RATA Nº 4, GRUPO D)

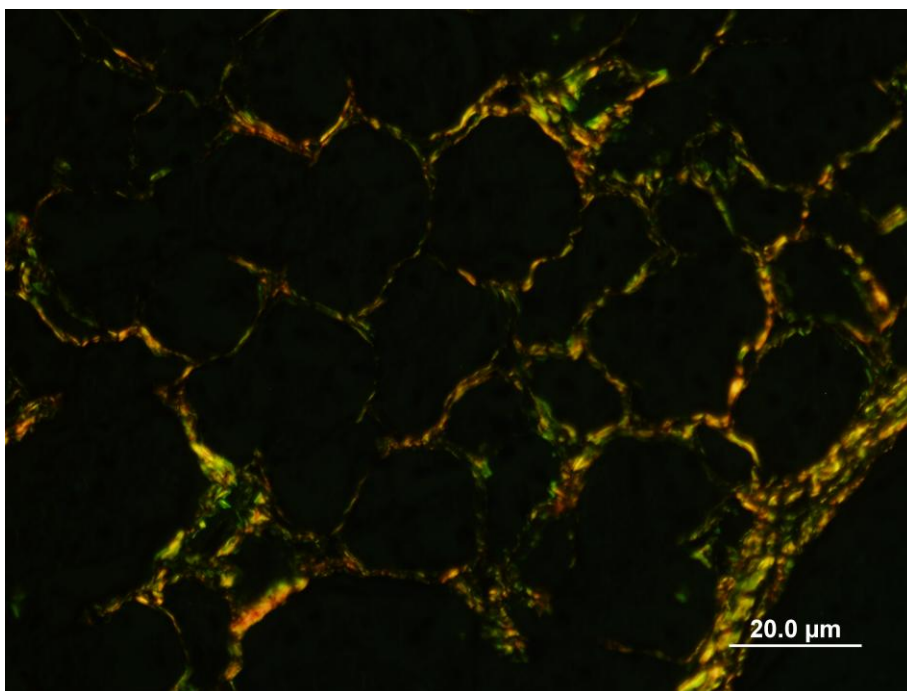


FIGURA 9 - PICROSIRIUS EM LUZ POLARIZADA (RATA Nº 5, GRUPO E)

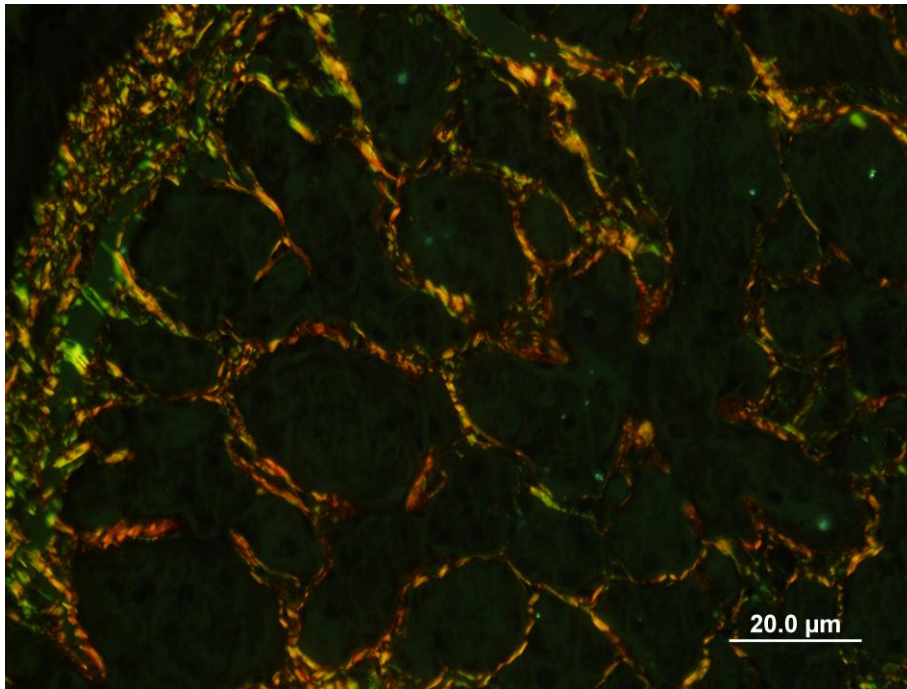


FIGURA 10 - PICROSIRIUS EM LUZ POLARIZADA (RATA Nº 9, GRUPO F)

## **4 RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISE GERAL E DO ESTROGÊNIO

Analisando o peso das ratas nos diferentes grupos verificamos que não houve diferença estatística entre eles, tanto entre as ooforectomizadas e não-ooforectomizadas, quanto em relação aos eventos de distensão vaginal (TAB. 1, GRÁFICOS 1 e 2). No decorrer do experimento, duas ratas evoluíram a óbito: uma durante o procedimento cirúrgico e outra no primeiro dia pós-operatório.

TABELA 1 – ANÁLISE DO PESO (OOFORECTOMIZADAS X NÃO-OOFORECTOMIZADAS)

Grupo	n	PESO		
		média	desvio-padrão	Mediana
Ooforectomizadas	30	0.50	0.03	0.50
Não-ooforectomizadas	28	0.51	0.03	0.50
valor-p1*			0.8377*	

p1: teste T de Student

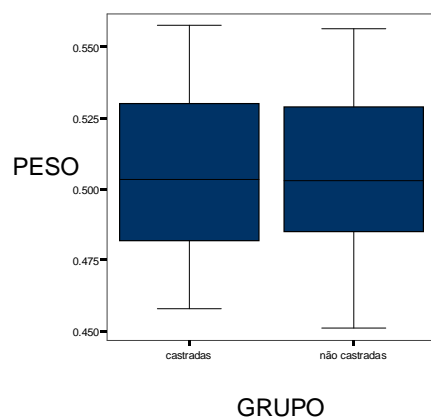


GRÁFICO 1 - PESO SEGUNDO OOFORECTOMIA

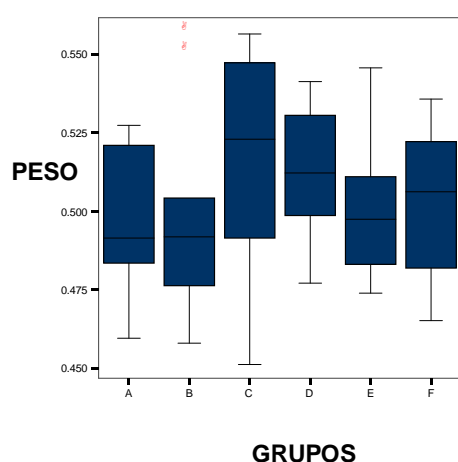


GRÁFICO 2 - PESO ENTRE OS GRUPOS

Quanto ao nível de estrogênio, verificamos que houve uma redução estatisticamente significativa analisando os grupos: ooforectomizadas e não-ooforectomizadas (TAB. 2, GRÁFICO 3). No estudo de comparações múltiplas as diferenças entre os grupos: controle x controle ooforectomizado; distensão vaginal por 30 minutos x distensão vaginal por 30 minutos + ooforectomia, houve diferença, porém não estatisticamente significativa (GRÁFICOS 4 e 5).

TABELA 2 - NÍVEL DE ESTROGÊNIO

Grupo	n	NÍVEL DE ESTROGÊNIO		
		média	desvio-padrão	mediana
Ooforectomizadas	30	217.1	75.6	218.7
Não-ooforectomizadas	28	371.7	170.0	292.0
valor-p1*			0.0002	
valor-p2*			< 0.0001	

\*p1: teste T de Student / teste de Mann-Whitney. p2: teste de Kruskal-Wallis / \* ANOVA

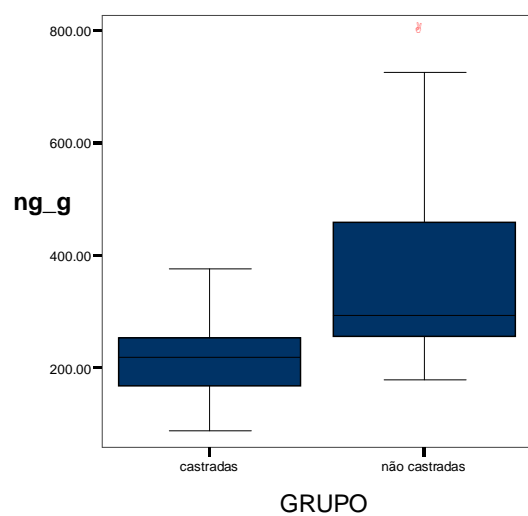


GRÁFICO 3 - NÍVEL DE ESTROGÊNIO SEGUNDO OOFORECTOMIA

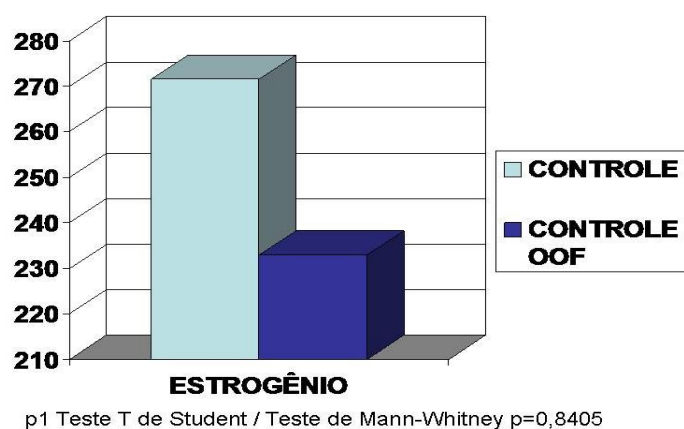


GRÁFICO 4 - ESTROGÊNIO ENTRE OS GRUPOS – CONTROLE X CONTROLE OOF.

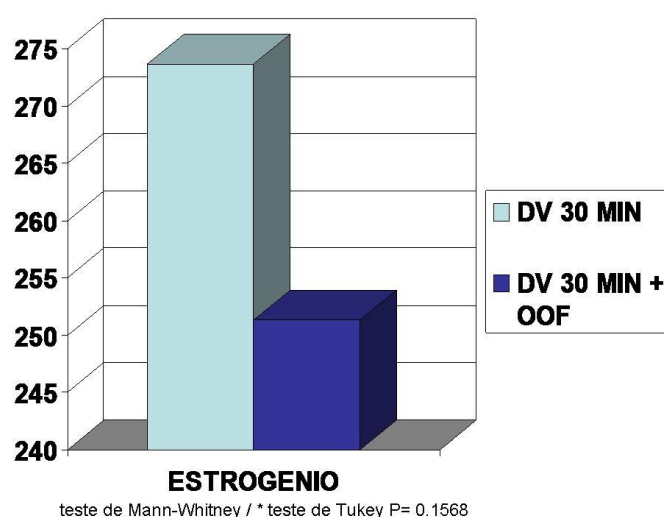


GRÁFICO 5 - ESTROGÊNIO ENTRE OS GRUPOS – DV 30 MIN X DV 30 MIN + OOF.

#### 4.2. ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENAS

Analisando o colágeno tipo III verificamos que houve uma redução da quantidade de fibras quando comparamos os controles x controles ooforectomizados (TAB. 3). Quando realizamos as demais comparações não encontramos diferenças significativas (TAB. 3).

TABELA 3 – COMPARAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS TIPO III

Grupo	COLÁGENO III			
	n	média	desvio-padrão	Mediana
Ooforectomizadas	75	25.2	21.8	16.3
Não-ooforectomizadas	75	33.9	23.0	33.3
*Valor-p1: 0.0108				
Controle	25	31.3	17.3	33.3
Controle ooforectomizado	25	11.5	11.2	7.0
*Valor-p2: 0.0003				

\*p1: teste de Mann-Whitney / \*p 2: teste de Kruskal-Wallis

Quanto ao colágeno tipo I, verificamos uma redução da quantidade de fibras quando comparamos: controles x controles ooforectomizados; controle x distensão vaginal por 30 minutos; controle x ooforectomia + distensão vaginal por 30 minutos e controle x distensão vaginal por 120 minutos (TAB. 4). Porém, não verificamos diferenças estatisticamente significativas entre os controles x distensão vaginal por 120 minutos + ooforectomia (TAB. 4/ GRÁFICO 6).

TABELA 4 – ANÁLISE DE FIBRAS COLÁGENAS TIPOI

<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>média</b>	<b>Desvio –padrão</b>	<b>Mediana</b>
Ooforectomizadas	75	36.4	23.1	30.3
Não- Ooforectomizadas	75	36.1	22.3	38.8
*valor-p1: 0.8117				
<b>Grupo</b>				
Controle	25	47.6	21.6	47.6
Controle ooforectomizado	25	32.0	23.8	22.1
Distensão vaginal 30m	25	26.3	20.4	17.2
Distensão vaginal 120m	25	34.4	20.3	31.5
Ooforectomia + distensão vaginal 30m	25	30.7	21.4	34.0
Ooforectomia + distensão vaginal 120m	25	46.4	21.4	50.1
*valor-p2: 0.0008				

p1: teste de Mann-Whitney / p 2: teste de Kruskal-Wallis

Analisando somente os grupos ooforectomizados, verificamos que houve elevação da quantidade de fibras tipo I quando comparamos o grupo ooforectomia + distensão vaginal por 30 minutos x ooforectomia + distensão vaginal por 120 minutos, bem como ooforectomizados x ooforectomia + distensão vaginal por 120 minutos (TAB. 4).



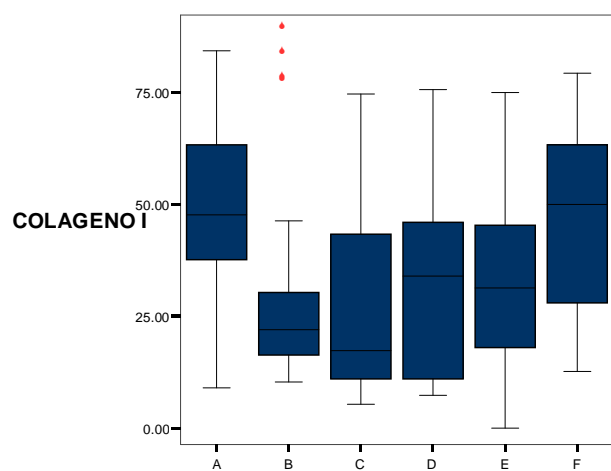


GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO I ENTRE OS GRUPOS

## **5 DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. MODELOS DE DISTENSÃO VAGINAL

O presente estudo visa verificar diferença entre a quantidade de fibras colágenas, em ratas submetidas à distensão vaginal e ooforectomia. Consiste em uma análise quantitativa das fibras, sem se ater a alterações funcionais.

Desde a primeira descrição, por Lin *et al*, em 1998 (46), os modelos de distensão vaginal aparecem na literatura como uma tentativa de elucidar a fisiopatologia da IUE. Os mesmos apresentam inúmeras diferenças entre si, desde os materiais utilizados na distensão até os critérios analisados.

Devido à praticidade na manipulação, bem como farta literatura a respeito, escolhemos ratas como objeto de estudo. Quanto à maneira de distensão vaginal, optamos pela utilização de sonda de Foley 10 Fr, com balonete insuflado com 3 ml de solução salina, conforme modelo descrito por Lin. Alguns autores utilizaram a mesma técnica (15,50,55), com inserção direta da sonda. Outros advogam a dilatação vaginal prévia, com sondas progressivamente maiores (48, 54, 57, 58), a fim de evitar ruturas vaginais, segundo descrição de Damaser *et al* (42). Em nossa casuística não observamos lesões vaginais significativas durante a realização do experimento, com isso, não verificamos necessidade de dilatação anterior ao procedimento.

Outras formas de distensão vaginal incluem: dilatação com 4ml no balonete da sonda de 10 Fr (49, 51). Sonda de 22 Fr com 5 ml de insuflação no balão (52), sonda de 18 Fr, com o mesmo volume utilizado no balonete (53). Assim como Rocha, acreditamos que 3 ml de insuflação corresponde a um volume suficiente, uma vez que atinge o diametro de 0,9 cm, o que equivale ao dobro do diâmetro cefálico médio do neonato rato (15).

Alguns autores utilizaram ratas prenhas (15,52,53) como uma tentativa de adicionar ao protocolo os efeitos acarretados pelo período de gestação. Nosso estudo, assim como descrições anteriores (42,46,47,48,53,55,57), utilizou ratas virgens, uma vez que a premissa foi avaliar exclusivamente os efeitos do modelo de simulação.

Análises funcionais, buscando correlacionar os experimentos a fatores objetivos de avaliação de IUE, demonstraram alterações nas pressões de perda em ratas submetidas ao protocolo, quando comparadas aos controles (42,47, 48,49).

O modelo utilizado para avaliação funcional, foi primeiramente descrito por Lin *et al* (1998), onde a narina do animal é estimulada com um fio do seu próprio bigode, provocando assim um reflexo de espirro, mesmo com o animal anestesiado, ocasionando a elevação da pressão intra-abdominal (46). Com isso, através de um cateter suprapúbico conectado a um sistema de aferição, pode-se estabelecer a pressão abdominal através da qual o animal perde urina.

Ainda no que é pertinente ao ponto de vista funcional, Canon *et al* (2002) verificaram a redução da pressão de perda com aumento do período de distensão (47). Pan *et al* (2007) corroboraram a ideia (48). Kamo *et al* (2006) especificaram que a alteração é mais marcante na porção média da uretra (49). Associando ooforectomia ao procedimento, Seivert *et al* (2001) observaram maior grau de IUE em ratas castradas (52), resultados semelhantes foram descritos por Ferguson *et al* (2005) (55). Já Resplande *et al* (2002) não verificaram diferença estatística comparando grupos semelhantes (53).

No presente estudo não executamos avaliações funcionais, apenas morfométricas.

Quanto às alterações anatomopatológicas, Lin *et al* (1998) observaram, à microscopia ótica, a redução da quantidade de fibras musculares uretrais nas ratas submetidas à distensão (46). Damaser *et al* (2003) verificaram, após 4 dias da lesão, através de microscopia ótica e eletrônica, degeneração de fascículos nervosos (42). Analisando o período de tempo em relação a lesão, Canon *et al* (2002) observaram um aumento progressivo da quantidade de disjunção entre fibras musculares uretrais, em relação a períodos maiores de distensão, 30 e 60 minutos (47).

Pan *et al* (2007) utilizando microscopia ótica, pós-coloração com tricômio de masson, analisaram tecido uretral de ratas submetidas a 1 e 4 horas de distensão vaginal, verificaram alterações inflamatórias e disjunção de musculatura com 4 e 10 dias. Na sexta semana evidenciou discretas alterações (48). O mesmo grupo identificou a hipóxia como possível mecanismo de lesão. Os autores avaliaram a premissa através da injeção/análise de microesferas e imuno-histoquímica (50). Analisando um sistema duplo de lesão, DV + ENP, Pan *et al*, (2009) verificaram,

através de microscopia ótica, disjunção de fibras musculares. Comparando os diferentes grupos observaram que estas alterações permaneciam, no grupo de lesões associadas, no vigésimo primeiro dia (57).

Quanto aos estudos que associaram ooforectomia bilateral (OB), Sievert *et al* (2001) verificaram, por meio de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica, diferenças entre os grupos analisados, como por exemplo, redução dos níveis de caveloina(52). Resplande *et al* (2002) utilizaram índice de apoptose, que se mostrou elevado nas camadas superficiais da uretra do grupo submetido ao procedimento duplo, associado à maior proporção de tecido conectivo entre as células musculares, no mesmo grupo (53).

## 5.2. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO

O colágeno exerce uma atividade importante na composição e na função do aparelho urogenital. Existem cerca de 19 tipos de colágeno conhecidos, sendo os colágenos tipo I e tipo III aqueles com principal importância no trato urogenital. Colágeno tipo I é o mais abundante na pele, tendões, ligamentos e osso e corresponde a cerca de 80 a 90 % do total de colágeno no organismo. Colágeno tipo III tem uma distribuição semelhante, mas, enquanto o tipo I está relacionado com sustentação, o tipo III relaciona-se com elasticidade (27,15). Mais recentemente, foi descrita avaliação de outros tipos de colágeno, por exemplo, tipo VII (62).

A produção e variação entre os diferentes tipos de colágeno é regulada por diversos fatores, entre eles, a ação dos estrogênios, uma vez que os fibroblastos apresentam receptores para estes hormônios (63).

O real papel do colágeno no aparelho urológico, bem como sua influência hormonal, tem sido alvo de debate. Desta maneira, o presente estudo visa avaliar, através de estereologia, a quantidade de fibras colágenas tipo I e tipo III, em ratas submetidas à DV + OB.

Falconer *et al* (1994) verificaram uma redução da síntese colágena em pele de mulheres incontinentes, postulando que este fato acarretaria alterações no mecanismo de sustentação (22). Analisando especificamente fáscia endopélvica,

Cor (2003) através de microscopia eletrônica e imuno-histoquímica, não verificou diferenças significativas entre mulheres continentas e incontinentes (27). Rechberger *et al* (1998) avaliando a fáscia pubocervical, verificaram uma quantidade diminuída de colágeno nas mulheres incontinentes, independentemente do *status* hormonal (25). Mais recentemente, Chen *et al* (2004) não encontraram diferenças significativas em biópsias de pele e fáscia endopélvica de mulheres incontinentes (67).

Buscando alterações tecido uretral e para-uretral em humanos, foram criados vários estudos. Keane *et al* (1997) observaram, por meio de eletroforese e dosagem de hidroxiprolina, uma redução do colágeno total e da relação col.I/col.III, e do *cross-linking* em mulheres incontinentes pré-menopausa(24). Por outro lado, em um estudo semelhante, Falconer *et al* (1994) observaram um aumento do colágeno total, bem como fibras com diâmetro maior; através de marcadores de RNA mensageiro, hidroxiprolina e microscopia eletrônica (26). Song *et al* (2007) analisaram exclusivamente o colágeno tipo III, verificando redução dos níveis deste, por meio de imuno-histoquímica, nas pacientes que apresentavam IUE (64). Em mulheres pós-menopausa, Goepel (2003) identificou, por meio de técnicas de imuno-histoquímica, uma redução de colágeno tipos I,II,III e VI nas pacientes incontinentes (65). Edwal (2005) postulou que o problema pode residir não exclusivamente na quantidade, mas sim no metabolismo (*turnover*) (66).

Em estudos experimentais o colágeno foi analisado em protocolos de castração seguida de reposição (68,69).

No presente estudo ratas virgens foram submetidas à DV + OB. No momento da eutanásia foram coletadas fezes de cada um dos animais separadamente, com o intuito de dosar o estrogênio fecal, segundo técnica descrita (60,61). Comparando os grupos ooforectomizadas x não-ooforectomizadas, encontramos diferença estatisticamente significativa. Porém, quando comparamos os controles x controles ooforectomizados não encontramos diferença significativa (TABELA 2). Isto pode ser explicado pelo fato de que as fezes de alguns animais estavam endurecidas no momento da coleta. Assim, com a perda de água, aumenta a concentração de estrogênio na análise. Além disso, elevações importantes dos níveis de estrogênio, como verificado no grupo E, podem ser explicadas por um possível mecanismo de pseudociese acarretado pela distensão vaginal.

O peso dos animais não variou na amostra, ou seja, redução hormonal não acarretou alterações significativas no peso dos animais.

Quanto à análise das fibras colágenas, inúmeros estudos proporcionam diversas formas de avaliação, como imuno-histoquímica (27,64,65), microscopia eletrônica (22), eletroforese (24), dosagem de hidroxiprolina (26), *western blot* (68,69).

Neste estudo, utilizou-se a estereologia, um método quantitativo, uma vez que a ideia do protocolo é estudar as variações quantitativas, como em outras análises (15,20,59). O princípio do estudos estereológicos é a compreensão interna, tridimensional de uma estrutura, a partir de informações obtidas em duas dimensões. Para tanto, utiliza princípios geométricos e estatísticos sobre informações colhidas a partir de microscopia ótica e eletrônica. Por meio de sistemas teste, sobrepostos à imagem morfológica, torna-se possível a quantificação das estruturas analisadas (29,59).

Assim, considerando a estereologia como uma aferição sem desvio, sem erro sistemático, esta consiste em uma boa opção para quantificação de fibras colágenas, objeto do presente estudo. Quanto à coloração empregada, utilizou-se picrossirius, própria para a proteína colágena, conferindo às fibras fortemente biorrefringentes cores em tons de laranja, amarelo e vermelho (colágeno tipo I), e às fibras fracamente biorrefringentes a cor verde (colágeno tipo III). A análise foi realizada em 05 campos, escolhidos aleatoriamente da uretra de cada uma das cinco ratas randomizadas entre os grupos, com a finalidade de aumentar a acurácia.

Por fim, quanto aos nossos resultados, verificamos a manutenção das fibras tipo III nos grupos não-ooforectomizados, o que tem suporte na literatura, em dois estudos de Rizk *et al* (68,69), onde verificou-se uma alteração da proporção col.I/col. III, às custas de colágeno tipo III em ratas ooforectomizadas que receberam reposição hormonal. Vai de encontro, entretanto, ao estudo de Augusburger (2007), que não observou diferença nos níveis de fibras colágenas tipo I e III em cadelas ooforectomizadas, quando comparadas ao controle (71).

Quanto às fibras do tipo I, estas tiveram sua concentração reduzida tanto nos grupos submetidos à ooforectomia, quanto aos submetidos à distensão vaginal, quando comparados ao grupo controle, exceto o grupo F.; ou seja, em nossa amostra, a castração, que visava simular o déficit hormonal causado pela

menopausa, proporcionou a redução na concentração das fibras tipo I. Estes dados são apoiados por dois estudos de Rizk *et al* (68,69). No primeiro estudo referido (2003), os autores verificam uma redução de fibras tipo I nos grupos ooforectomizados quando comparados ao *sham*. O mesmo grupo de autores observou a mesma alteração, tanto em ratas jovens, quanto em ratas com idade mais avançada (70). Tem suporte ainda, nos dados de Goepel (2003), que verificou uma redução das fibras colágenas em mulheres pós-menopausa (65). Os dados do presente estudo vão de encontro a Chen *et al* (2004), que postula que não existe alterações nas fibras colágenas, bem como Falconer *et al* (67,26).

Entre as ooforectomizadas, verificamos ainda um aumento das fibras tipo I, quando comparamos o período de distensão prolongado, mesmo com a elevação, os níveis não alcançaram os níveis do grupo controle. Assim, pode-se dizer que o trauma vaginal nesta condição possa induzir a uma elevação da quantidade deste tipo de fibras, quando associado à redução estrogênica.



## **6 CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que:

1. As ratas normoestrogênicas apresentaram manutenção dos níveis de fibras colágenas tipo III.
2. As ratas ooforectomizadas apresentaram uma redução das fibras colágenas tipo I em relação aos controles não-ooforectomizados. Entre as ratas ooforectomizadas, observou-se um aumento na concentração de fibras colágenas do tipo I naquelas submetidas à distensão vaginal por período prolongado.

## REFERÊNCIAS

1. RETZKY, S.S.; ROGERS, R.M.J. Urinary incontinence in women. **Clin. Symp.**, Summit, v.47, p.2–32, 1995.
2. KETNON, K.; MUELLER, E.R. The global burden of female pelvic floor disorders. **Br. J. Urol.**, Edinburgh, v. 98, p.1–5, 2006.
3. RORTVEIT, G. *et al.* Age and type-dependent effects of parity on urinary incontinence. The Norwegian EPINCONT study. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v.98, p.1004–1010, 2006.
4. KOBI, S. *et al.* Pelvis architecture and urinary incontinence in women. **Eur. Urol.**, Basel, v.52, n.1, p.239–244, 2007.
5. MEYER, S. *et al.* The effects of birth on urinary continence mechanisms and other pelvic-floor characteristics. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v.92, n.4, p.613-618, 1998
6. DIETZ, H. P.; SCHIERLITZ, L. Pelvic floor trauma in childbirth – myth or reality? **Aust. NZ. J. Obstet. Gynaecol.**, Melbourne, v. 45, n., p. 3-11, 2005.
7. SMITH, A.R. *et al.* The role of pudendal nerve damage in the aetiology of genuine stress incontinence in women. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Londres, v.96, n.1, p.29-32, 1989.
8. ALLEN, R. E. *et al.* Pelvic Floor damage and childbirth: a neurophysiological study. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Londres, v. 97, p.770-779, 1990.
9. SNOOKS, S.J. *et al.* Perineal nerve damage in genuine stress incontinence: An electrophysiology study. **Br. J. Urol.**, Edinburgh, v. 57, p.422–426, 1985.
10. ROBINSON, D. Effects of estrogen and progestin replacement on the urogenital tract of the ovariectomized cynomolgus monkey. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v. 15, p. 215-221, 1996.
11. FANTL, J. A. *et al.* Postmenopausal urinary incontinence: comparison between non-estrogen-supplemented and estrogen supplemented women. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v 71, p. 823-828, 1998
12. SORENSEN, S. Urodynamic investigations and their reproducibility in healthy postmenopausal females. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, Stockholm, v.114, p. 42-47, 1998.

13. VIKTRUP, L. L. G.; ROLFF M.; BARFOED, K. The symptom of stress incontinence caused by pregnancy or delivery in primiparas. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v. 79, p. 945-951, 1992.
14. PODNAR, S.; LUKANOVIC, A.; VODUSEK, D. B. Anal sphincter electromyography after vaginal delivery: neuropathic insufficiency or normal wear and tear? **Neurourol. Urodyn.**, New York, v.19, p.249-254, 2000.
15. ROCHA, M. **Estudo histomorfométrico e imuhistoquímico da uretra de ratas adultas após diferentes formas de parto**. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2004.
16. MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biol. Int.**, London, v. 20, n. 1, p.15-27,1996.
17. EWALT, D.H. *et al.* Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? **J. Urol.**, Baltimore, v.148, n.2, p.544 -549, 1992.
18. BAKIRCIOGLU, M.E. *et al.* The effect of pregnancy and delivery on the function and ultrastructure of the rat bladder and urethra. **Br. J. Urol.**, Edinburgh, v.85, n.3, p. 350-361, 2000.
19. SNOOKS, S.J. *et al.* Effects of vaginal delivery on the pelvic floor: a 5-year follow-up. **Br J Surg.**, Guildford, v. 77, p.1538-1560, 1990.
20. HALE, D.S. *et al.* Histologic analysis of needle biopsy of urethral sphincter from women with normal and stress incontinence with comparison of electromyographic findings. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St.Louis, v.180, n. 2, p.342-348, 1999.
21. KOO, H.P. *et al.* Temporal expression of elastic fiber components in bladder development. **Connect. Tissue Res.**, London, v.37, n.1-2, p.1-11, 1998.
22. FALCONER, C. *et al.* Decreased collagen synthesis in stress-incontinence women. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v.84, n.4, p.583-586, 1994.
23. BERGMAN, A. *et al.* Biochemical composition of collagen in continent and stress urinary incontinent women. **Gynecol. Obstet. Invest.**, Basel, v.37, n.1, p.48-51, 1994.
24. KEANE, D.P. *et al.* Analysis of collagen status in premenopausal nulliparous women with genuine stress incontinence. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Londres, v.104, n.9, p.994-998, 1997.
25. RECHBERGER, T. *et al.* Role of fascial collagen in stress urinary incontinence. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.179, n.6, p.1511-1514, 1998.
26. FALCONER, C. *et al.* Different organization of collagen fibrils in stress incontinent women of fertile age. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, Stockholm, v.77, p.87-94, 1994.

27. CÖR, A.; BARBIC, M.; KRALJ, B. Differences in the quantity of elastic fibres and collagen type I and type III in endopelvic fascia between women with stress urinary incontinence and controls. **Urol. Res.**, Berlin, v.31 n.2, p.61-65, 2003.
28. MANDARIM-DE-LACERDA, C. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v.75, n. 4, p.469-486. 2003.
29. CULLEN, W. C.; FLETCHER, T.F.; BRADLEY, W.F. Morphometry of the male feline pelvic urethra. **Urol. Res.**, v.1, p.186-189, 1983.
30. AUGSBURGER, H.R.; CRUZ-ORIVE, LM. Influence of ovariectomy on the canine striated external urethral sphincter (M. urethralis): a stereological analysis of slow and fast twitch fibres. **Urol. Res.**, Berlin, v. 26, n.6:, p.417-422, 1998.
31. HIJAZ, A.; DANESHGARI, F.; SIEVERT, K.; DAMASER, M. *et al* Animal Models of Female Stress Urinary Incontinence. **Urol. Res.**, Berlin, v. 179, p.2103-2110, 2008.
32. RODRIGUEZ, L.V. *et al*. New objective measures to quantify stress urinary incontinence in a novel durable animal model of intrinsic sphincter deficiency. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v.288, p.1332-1238, 2005.
33. PENG, C.W. *et al*. External urethral sphincter activity in a rat model of pudendal nerve injury. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v. 25, 2006; v. 25, p. 388 -395, 2006.
34. TAKAHASHI, S. *et al*. Periurethral injection of sustained release basic fibroblast growth factor improves sphincteric contractility of the rat urethra denervated by botulinum-A toxin. **J. Urol.**, Baltimore, v.176, p.819-823, 2006.
35. CHERMANSKY, C. *et al*. A model of intrinsic sphincteric deficiency in the rat: electrocauterization. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v.23, n.2 , p.166-171, 2004.
36. SNOOKS, S.J. *et al*. Risk factors in childbirth causing damage to the pelvic floor innervation. **Int. J. Colorectal. Dis.**, Berlin, v.1, n.1, p.20, 1986.
37. BENSON, J.T. Neurophysiology of the female pelvic floor. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, Philadelphia, v.6, n.4, p.320-323, 1994.
38. TETZSCHNER, T. *et al*. Delivery and pudendal nerve function. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, Stockholm, v.76, n.4, p.324 -331, 1997.
39. OLSEN, A.L. *et al*. Pelvic floor nerve conduction studies: establishing clinically relevant normative data. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.189, n.4, p.1114-1119, 2003.
40. SNOOKS, S.J.; BARNES, P.R.; SWASH, M. Damage to the innervation of the voluntary anal and periurethral sphincter musculature in incontinence: an

electrophysiological study. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, London, v.47, p.1269-1273, 1984.

41. KERNS, J.M. *et al.* Effects of pudendal nerve injury in the female rat. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v.19, n. 1, p. 53- 69, 2000.

42. DAMASER, M.S. *et al.* Functional and neuroanatomical effects of vaginal DISTENTION and pudendal nerve crush in the female rat. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v.170, n.3, p.1027-1031, 2003.

43. AHN, H.; LIN, D.L.; ESPARZA, N.; DAMASER, M.S. Short-term timecourse of bilateral pudendal nerve injury on leak-point pressure in female rats. **J. Rehabil. Res. Dev.**, Washington, v. 42, n.1, p.109 –114, 2005.

44. AHMED, Y. *et al.* Effect of estrogen on urethral function and nerve regeneration following pudendal nerve crush in the female rat. **J. Urol.**, Baltimore, v.175, n.5, p.1948 -1952, 2006.

45. KANE, D.D. *et al.* Early structural effects of oestrogen on pudendal nerve regeneration in the rat. **BJU Int.**, Edinburgh, v.93, n.6, p.870-878, 2004.

46. LIN, A.S. *et al.* Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. **Urology**, Ridgewood v.52, n.1, p.143–151, 1998.

47. CANNON, T.W. *et al.* Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. **Br. J. Urol.**, Edinburgh, v.90, n.4, p. 403-407, 2002.

48. PAN, H.Q. *et al.* Increased duration of simulated childbirth injuries results in increased time to recovery. **Am. J. Physiol, Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v.292, n. 4, p1738-1744, 2007.

49. KAMO, I. *et al.* Functional analysis of active urethral closure mechanisms under sneeze induced stress condition in a rat model of birth trauma. **J. Urol.**, Baltimore, v. 176, n.6, p.2711-2715, 2006.

50. DAMASER, M.S. *et al.* Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. **J. Appl. Physiol.**, Washington, v. 98, n. 5, 1884-1890, 2005.

51. PRANTIL, R. *et al.* Ex vivo biomechanical properties of the female urethra in a rat model of birth trauma. **Am. J. Physiol., Ren. Physiol.**, Bethesda, v.292, n.4, p.1229-37, 2007.

52. SIEVERT, K.D. *et al.* The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. Part I: functional and structural change. **J. Urol.**, Baltimore, v.166, n.1, p.311-317, 2001.

53. RESPLANDE, J. *et al.* Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. **J. Urol.**, Baltimore, v.168, n.1, p. 323-330, 2002.
54. KUO, H.C. Effects of vaginal trauma and oophorectomy on the continence mechanism in rats. **Urol. Int.**, Basel, v.69, n.1, p.36-41, 2002.
55. FERGUSON, C.L. *et al.* Short-term functional and neuroregenerative response of the urethra to ovariectomy and vaginal distension in female rats. **Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.**, Surrey, v.16, n. 2 , p.119-125, 2005.
56. DAMASER, M.S. *et al.* Urodynamic function and expression of neurotrophins after a maternal childbirth injury model of vaginal distension and pudendal nerve crush in rats. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v.26, p.696-701, 2007.
57. PAN, H.Q. *et al.* Dual simulated childbirth injury delays anatomic recovery. **Am. J. Physiol., Ren. Physiol.**, Bethesda, v.296, n. 2, p.277-283, 2009.
58. JIANG, H. H. *et al.* Dual simulated childbirth injuries result in slowed recovery of pudendal nerve and urethral function. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v.28, n. 3, p.229-235, 2009.
59. FRAGA, R. **Influência da ooforectomia e da reposição de estradiol no volume das colágenas tipo IV da membrana basal vesical, em ratas.** Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
60. TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1046, p. 54-74, 2005.
61. MUNRO, C.J. *et al.* Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clin. Chem.**, New York, v.37, p 838-844, 1991.
62. RADZISZEWSK, P.; BORKOWSKI, A.; TORZ, C. Distribution of collagen type VII in connective tissues of postmenopausal stress-incontinent women. **Gynecol. Endocrinol.**, v.20, n.3, p.121-126, 2005.
63. KLUTKE, J.; BERGMAN, A. Hormonal influence on the urinary tract. **Urol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.22, n.3, p.629-639, 1995.
64. SONG, Y. *et al.* Changes of collagen type III and decorin in paraurethral connective tissue from women with stress urinary incontinence and prolapse. **Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.**, Surrey, v.18, n.12, p.1459-1463, 2007.

65. GOEPEL, C.; HEFLER, L.; METHFESSEL, H. Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, Stockholm, v.82, p.659-664, 2003.
66. EDWALL, L.; CARLSTROM, K.; JONASSON, A. Markers of collagen synthesis and degradation in urogenital tissue from women with and without stress urinary incontinence. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v.24, n.4, p 319-324, 2005.
67. CHEN, Y. *et al.* Collagen synthesis is not altered in women with stress urinary incontinence. **Neurourol. Urodyn.**, New York, v. 23, n.4, p.367-373, 2004.
68. RIZK, D. *et al.* Effects of ovariectomy and hormone replacement on collagen and blood vessels of the urethral submucosa of rats. **Urol. Res.**, Berlin, v.31, n.3, p.147–151, 2003.
69. RIZK, D., *et al.* A. Combined estrogen and ghrelin administration restores number of blood vessels and collagen tipe I/III ration in urethral and anal canal submucosa of old ovariectomized rats. **Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.**, Surrey., v.19, p. 547-552, 2008.
70. RIZK, D. *et al.* The effect of ovariectomy on biomarkers of urogenital ageing in old versus young adult rats. **Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.**, Surrey , v.18, n.9, p.1077-1085, 2007.
71. AUGSBURGER, H.; OSWALD, M. Immunohistochemical analysis of collagen types I, III, IV and  $\alpha$ -actin in the urethra of sexually intact and ovariectomized beagles **Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.**, Surrey, v. 18, n. 9, p.1071–1075, 2007.



## **APÊNDICES E ANEXOS**

**ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-UFPR**

Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)

**Nº 328****CERTIFICADO**

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**CERTIFICATION**

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**PROCESSO:** 23075.014108/2008-77**APROVADO:** 09/09/2008 – R.O. 08/2008**TÍTULO:** Efeitos da distensão vaginal na anatomia do assoalho pélvico:  
estudo experimental em ratas**AUTORES:** Rogério de Fraga, Gustavo Lenci Marques, Camilo Dallagnol,  
Sérgio Luiz Rocha, Luciane B.C. Oliveira, Edison Luiz P. Farias,  
Lucélia Donatti**DEPARTAMENTO:** Anatomia  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador do CEEA

## APÊNDICE 1 - TABELAS (AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA)

	ng_mL				Peso				Nível de Estrogênio			
	n	média	desvio-padrão	mediana	n	média	desvio-padrão	Mediana	n	média	desvio-padrão	mediana
<b>Grupo</b>												
Ooforectomizadas	30	21.9	7.7	22.5	30	0.50	0.03	0.50	30	217.1	75.6	218.7
Não-ooforectomizadas	28	37.6	17.4	31.3	28	0.51	0.03	0.50	28	371.7	170.0	292.0
valor-p1			0.0002				0.8377*				0.0002	
<b>Grupo</b>												
Controle	9	26.8	9.7	23.3	9	0.50	0.03	0.49	9	271.6	103.2	225.4
Controle ooforectomizado	10	23.2	5.5	23.0	10	0.50	0.03	0.49	10	233.0	50.7	233.0
Distensão vaginal 120m	9	49.7	15.2	45.6	9	0.50	0.03	0.50	9	496.2	157.1	478.9
Distensão vaginal 30m	10	36.4	18.8	29.1	10	0.52	0.03	0.52	10	349.8	170.9	273.7
Ooforectomia + distensão vaginal 120m	10	15.2	6.0	13.3	10	0.50	0.02	0.51	10	150.8	58.8	132.6
Ooforectomia + distensão vaginal 30m	10	27.3	6.3	25.4	10	0.51	0.02	0.51	10	267.5	66.6	251.3
valor-p2			< 0.0001				0.6476				< 0.0001	

p p1: teste T de Student / \* teste de Mann-Whitney, p2: teste de Kruskal-Wallis / \* ANOVA

TABELA 5 (PESO E NÍVEL DE ESTROGÊNIO)

Comparações Múltiplas			PB*	pg_well	ng_ml	Nível de Estrogênio
			Valor-p	Valor-p	Valor-p	Valor-p
Controle	X	Controle ooforectomizado	<b>0.0001</b>	<b>0.0047</b>	0.7783	0.8405
Controle	X	Distensão vaginal 30m	0.1126	0.0962	0.0962	0.2218
Controle	X	Distensão vaginal 120m	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.0047</b>	<b>0.0117</b>	<b>0.0117</b>
Controle	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.0027</b>	0.7176	0.7176
Controle	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	<b>0.0139</b>	0.3210	<b>0.0114</b>	<b>0.0080</b>
Controle ooforectomizado	X	Distensão vaginal 30m	0.1680	<b>0.0326</b>	<b>0.0203</b>	<b>0.0203</b>
Controle ooforectomizado	X	Distensão vaginal 120m	0.9998	1.0000	<b>0.0027</b>	<b>0.0027</b>
Controle ooforectomizado	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	0.5552	0.1781	0.1781	0.2016
Controle ooforectomizado	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	0.6209	<b>0.0106</b>	<b>0.0106</b>	<b>0.0106</b>
Distensão vaginal 30m	X	Distensão vaginal 120m	0.1078	0.0710	0.0710	0.0710
Distensão vaginal 30m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	<b>0.0020</b>	<b>0.0106</b>	0.2274	0.1568
Distensão vaginal 30m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	0.9564	0.6822	<b>0.0033</b>	<b>0.0039</b>
Distensão vaginal 120m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	0.7537	0.2518	<b>0.0047</b>	<b>0.0056</b>
Distensão vaginal 120m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	0.4723	<b>0.0228</b>	<b>0.0023</b>	<b>0.0023</b>
Ooforectomia + distensão vaginal 30m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	<b>0.0239</b>	<b>0.0046</b>	<b>0.0046</b>	<b>0.0064</b>

Teste de Mann-Whitney / \* teste de Tukey

TABELA 6 (ESTROGÊNIO ENTRE OS GRUPOS)

Grupo	COLÁGENOIII				COLÁGENOI				OUTROS			
	n	média	desvio-padrão	mediana	n	média	desvio-padrão	mediana	n	média	desvio-padrão	mediana
Castradas	75	25.2	21.8	16.3	75	36.4	23.1	30.3	75	38.3	36.7	10.2
Não-castradas	75	33.9	23.0	33.3	75	36.1	22.3	38.8	75	28.7	35.3	5.2
valor-p1			0.0108				0.8117				0.2488	
<b>Grupo</b>												
Controle	25	31.3	17.3	33.3	25	47.6	21.6	47.6	25	21.2	30.6	5.5
Controle ooforectomizado	25	11.5	11.2	7.0	25	32.0	23.8	22.1	25	56.4	28.8	64.8
Distensão vaginal 120m	25	38.4	25.2	45.8	25	34.4	20.3	31.5	25	23.3	33.7	4.6
Distensão vaginal 30m	25	31.9	25.8	18.5	25	26.3	20.4	17.2	25	41.7	38.9	64.0
Ooforectomia + distensão vaginal 120m	25	35.2	21.7	35.7	25	46.4	21.4	50.1	25	18.4	31.5	3.0
Ooforectomia + distensão vaginal 30m	25	29.0	23.4	21.3	25	30.7	21.4	34.0	25	40.2	39.7	10.2
valor-p2			0.0003				0.0008				0.0099	

p1: teste de Mann-Whitney / p 2: teste de Kruskal-Wallis

TABELA 7 (COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS)

Comparações Múltiplas			COLÁGENOIII	COLÁGENOI	OUTROS
Controle	X	Controle ooforectomizado	<b>0.0003</b>	<b>0.0302</b>	<b>0.0038</b>
Controle	X	Distensão vaginal 30m	0.9385	<b>0.0018</b>	0.5696
Controle	X	Distensão vaginal 120m	0.2310	<b>0.0317</b>	0.3042
Controle	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	0.6297	<b>0.0103</b>	0.5727
Controle	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	0.6504	0.9615	0.1365
Controle ooforectomizado	X	Distensão vaginal 30m	<b>0.0028</b>	0.1294	0.3464
Controle ooforectomizado	X	Distensão vaginal 120m	<b>0.0003</b>	0.4414	<b>0.0038</b>
Controle ooforectomizado	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	<b>0.0100</b>	0.5567	0.3320
Controle ooforectomizado	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	<b>0.0002</b>	<b>0.0331</b>	<b>0.0013</b>
Distensão vaginal 30m	X	Distensão vaginal 120m	0.4586	0.1390	0.1441
Distensão vaginal 30m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	0.5436	0.4821	0.8168
Distensão vaginal 30m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	0.6997	<b>0.0012</b>	0.1246
Distensão vaginal 120m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 30m	0.1520	0.4528	0.1519
Distensão vaginal 120m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	0.5249	<b>0.0460</b>	0.8168
Ooforectomia + distensão vaginal 30m	X	Ooforectomia + distensão vaginal 120m	0.4191	<b>0.0106</b>	0.0869

teste de Mann-Whitney

TABELA 8 (COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS)

## ANEXO 2 - TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE HEMOTOXILINA E EOSINA

Técnica:

- 1- Lavar em água corrente;
- 2 - Corar em solução de hematoxilina de Harris por 50 segundos;
- 3- Lavar em água corrente;
- 4- Água amoniacal;
- 5- Corar em solução de eosina;
- 6- Lavar, desidratar, diafanizar e montar.

Soluções: Hematoxilina de Harris:

- hematoxilina - 5 g;
- álcool etílico - 50 ml;
- alúmen de potássio - 100 g;
- água destilada - 950 ml;
- óxido de mercúrio - 2,5 g;
- ácido acético glacial - 40 ml.

Dissolver a hematoxilina no álcool levemente aquecido (56°C) em banho-maria; dissolver o alúmen de potássio em água destilada aquecida em chama, acrescentar a solução alcóolica de hematoxilina e deixar ferver. Adicionar o óxido de mercúrio e então o ácido acético. Filtrar.

### **ANEXO 3 - TÉCNICA DECOLORAÇÃO DE PICROSIRIUS**

#### Técnica

- 1- Desparafinizar os cortes histológicos em xilol
- 2- Hidratar – série decrescente de álcool até a água
- 3- Solução de uso do Vermelho Picro-sirius – 30 min
- 4- Lavagem na água destilada
- 5- Passar em três cubas com álcool – 10 mergulhos cada
- 6- Passar em três cubas com xilol – 10 mergulhos
- 7- Montagem habitual com lamínula

#### Solução de Vermelho Picro-sirius:

- água destilada 100 ml
- ácido Pícrico o suficiente para tornar a solução saturada
- filtrar a solução para tirar o depósito
- sirius Red 0,1 g
- fast-green 0,1 g

#### Solução de uso do Vermelho Picro-sirius

Misturar os dois corantes pesados na solução saturada e filtrada de ácido pícrico.